

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 04-126075
 (43)Date of publication of application : 27.04.1992

(51)Int.Cl. C12N 9/04
 //C12N 9/04
 C12R 1:07)

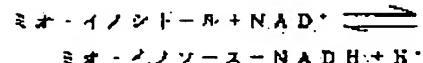
(21)Application number : 02-249775 (71)Applicant : ASAHI CHEM IND CO LTD
 (22)Date of filing : 18.09.1990 (72)Inventor : TAKAHASHI MAMORU
 MATSUURA KAZUO

(54) MYO-INOSITOL DEHYDROGENASE AND PRODUCTION THEREOF

(57)Abstract:

PURPOSE: To obtain myo-inositol dehydrogenase having excellent heat-stability, etc., and exhibiting specific substrate specificity, enzymatic action, etc., at a low cost by culturing a microbial strain belonging to genus *Bacillus* and capable of producing myo-inositol dehydrogenase in a medium and separating the subject enzyme from the cultured product.

CONSTITUTION: A microbial strain belonging to genus *Bacillus* and capable of producing myo-inositol dehydrogenase (e.g. *Bacillus* sp. No.3, FERM BP-3013) is cultured in a medium and myo-inositol dehydrogenase is separated from the cultured product. The enzyme has substrate specificity to myo-inositol and catalyzes the reaction to produce myo-inosose, NADH and H⁺ from myo-inositol and NAD⁺. The residual activity of the enzyme is ≥95% at 60° C and a reagent for determining myo-inositol in high accuracy can be produced by using the enzyme.



LEGAL STATUS

[Date of request for examination]

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of extinction of right]

(19)日本国特許庁 (J P)

(12) 特 許 公 報 (B 2)

(11)特許番号

第2984043号

(45)発行日 平成11年(1999)11月29日

(24)登録日 平成11年(1999)9月24日

(51)Int.Cl.⁶
C 1 2 N 9/04
// (C 1 2 N 9/04
C 1 2 R 1:07)

識別記号

F I
C 1 2 N 9/04

Z

請求項の数4(全12頁)

(21)出願番号 特願平2-249775
(22)出願日 平成2年(1990)9月18日
(65)公開番号 特開平4-126075
(43)公開日 平成4年(1992)4月27日
審査請求日 平成9年(1997)8月26日
微生物の受託番号 F E R M B P - 3 0 1 3

(73)特許権者 99999999
旭化成工業株式会社
大阪府大阪市北区堂島浜1丁目2番6号
(72)発明者 高橋 守
静岡県駿東郡清水町柿田684-1
(72)発明者 松浦 一男
静岡県田方郡堇山村四日市1005-5
(74)代理人 弁理士 小林 和憲 (外1名)
審査官 富永 みどり

(58)調査した分野(Int.Cl.⁶, DB名)
C12N 9/00 - 9/99
B I O S I S (D I A L O G)
W P I (D I A L O G)

(54)【発明の名称】ミオ・イノシトールデヒドロゲナーゼおよびその製造法

(57)【特許請求の範囲】

【請求項1】基質特異性として少なくともミオ・イノシトールに基質特異性を有し、酵素作用として下記式
ミオ・イノシトール+NAD¹■ミオ・イノソース+NADH+
H¹

に示すように少なくともミオ・イノシトールおよびNAD¹からミオ・イノソースおよびNADH+H¹を生成する反応を触媒するミオ・イノシトールデヒドロゲナーゼにおいて、

60°Cにおける残存活性が95%以上であること、ミオ・イノシトールに対するK_m値が約0.64mMであること、NAD¹に対するK_m値が約0.004mMであること、分子量が130,000±15,000 (TSKゲルG3000SWによる濾過法)、及び至適pHがpH9.5付近であること、とを有することを特徴とするミオ・イノシトールデヒドロゲナーゼ。

12 ゲナーゼ。

【請求項2】少なくとも下記の理化学的性状を有する請求項1記載のミオ・イノシトールデヒドロゲナーゼ。

(1)分子量 : 130,000±15,000 (TSKゲルG3000SWによる濾過法)

(2)等電点 : pH4.5±0.5

(3)至適pH : pH9.5付近

(4)pH安定性 : pH6.5~9.0で80%以上の残存活性を有する。

【請求項3】請求項1のミオ・イノシトールデヒドロゲナーゼにおいて、バチルス属に属するミオ・イノシトールデヒドロゲナーゼ生産菌を培地に培養し、得られた培養物からミオ・イノシトールデヒドロゲナーゼを採取することを特徴とするミオ・イノシトールデヒドロゲナーゼの製造法。

【請求項4】請求項1のミオ・イノシトールデヒドロゲナーゼにおいて、バチルス属に属するミオ・イノシトールデヒドロゲナーゼ生産菌が、バチルス・エスピ-No.3〔微研条寄第3013号 (FERM BP-3013) 〕である請求項3記載の製造法。

【発明の詳細な説明】

【産業上の利用分野】

本発明は、新規かつ有用なミオ・イノシトールデヒドロゲナーゼおよびその製造法に関する。さらに詳しくは、臨床生化学検査、食品検査などにおけるミオ・イノシトールの測定に利用されるミオ・イノシトールデヒドロゲナーゼおよびその製造法に関する。

【従来の技術】

ミオ・イノシトールはイノシトールの9つの異性体の1つで、極めて安定した環状アルコールである。人の場合、ミオ・イノシトールは食事により1日約1g、腎臓における合成により約2gが供給され、細胞への取り込みと腎臓における排泄・再吸収および酸化により血しょうレベルがほぼ一定になるように調節されている。そのため腎機能障害において血しょうミオ・イノシトールレベルの著明な増加が見られる〔臨床科学24巻、11号、1448-1455頁、嘉門信雄〕。このようにミオ・イノシトールを測定することによって腎機能のモニタリングができる。

従来、ミオ・イノシトールはガスクロマトグラフィー、高速液体クロマトグラフィー等で測定されており、臨床生化学ではミオ・イノシトールデヒドロゲナーゼを用いてミオ・イノシトールを測定する例は知られていない。

公知のミオ・イノシトールに基質特異性を有し、少なくともミオ・イノシトールおよびNAD⁺からミオ・イノソースおよびNADH+H⁺を生成する反応を触媒する酵素生産菌として知られているAerobacter aerogenes [Methods in Enzymology 36、326 (1962) (V)] の生産する酵素は至適pHが9.0、ミオ・イノシトールに対するK_m値は 1.25×10^{-3} Mであり、NAD⁺に対するK_m値は 3.3×10^{-4} Mであると記載されている。(酵素ハンドブック、朝倉書店発行、p.6)。また、公知の本酵素生産菌として知られている、Klebsiella pneumoniae、Serratia marcescens (酵素ハンドブック、p.6) の2種は標準微生物学第2版 (医学書院、p.209-212) によると肺炎あるいは日和見感染起因菌として化学療法剤、抗生物質に抵抗性を有する難治性感染菌として知られており、工業的規模で培養することは避けなければならず、現状ではこれら生産菌による当該酵素の性状についての報告はない。更に、従来公知のCryptococcus melibiosum [Biochem. Biophys. Acta, 293, 295-303 (1973)] の生産する酵素のミオ・イノシトールに対するK_m値は 5.1×10^{-3} Mであり、NAD⁺に対するK_m値は 6.9×10^{-5} Mであると記載されている。(酵素ハンドブック、p.6)。その他、本酵素

は動物の器官として牛の脳 [Biochem. Biophys. Res. Commun., 68:1133-1138 (1976)] に存在することが知られているが、酵素を分離するために常に新鮮な脳を入手することは非常に困難なことである上に経済的でなく、また分子量は74,000であると記載されている。

【発明が解決しようとする課題】

このように公知の酵素はその生産菌 (Aerobacter, Klebsiella, Serratia) が感染菌であったり、Cryptococcus melibiosum由来の酵素のようにミオ・イノシトールおよびNAD⁺に対するK_m値が高いために十分な反応速度が得られなかつたり、牛の脳のように新鮮な原料を常に多量に入手することが困難であった。

【課題を解決するための手段】

そこで、本発明者らは、ミオ・イノシトールを測定する目的で、危険性のない、培養活性の高い、基質であるミオ・イノシトールとNAD⁺に対するK_m値のできるだけ低い、安定で精製の簡単な酵素を生産する菌株を広く自然界よりスクリーニングしたところ、静岡県賀茂郡東伊豆町熱川の温泉近くの土壤より分離したBacillus・sp No.3菌株が目的とする良好な性質を有する新規なミオ・イノシトールデヒドロゲナーゼを産生することを見出し、本発明を完成了。

即ち、本発明は、pH8.5において測定したミオ・イノシトールとNAD⁺に対するK_m値がそれぞれ0.6-1mM、0.004mMと非常に低い、反応性の高い性質を有し、かつては60℃の緩衝液中で約15分間処理した後の活性が、処理前の活性の95%以上の値を保持している優れた熱安定性を有している新規なミオ・イノシトールデヒドロゲナーゼを提供するものである。また、本発明は、バチルス属に属するミオ・イノシトールデヒドロゲナーゼ生産菌を培地に培養し、得られた培養物からミオ・イノシトールデヒドロゲナーゼを採取することを特徴とするミオ・イノシトールデヒドロゲナーゼの製造法を提供するものである。

ミオ・イノシトールデヒドロゲナーゼ生産菌はバチルス属に属するが、例えば本発明者らが分離したNo.3菌株は、本発明に最も有効に使用される菌株の一例であつて、本菌株の菌学的性質を示すと次の通りである。

尚、本菌株の同定に当たっては、同定実験は医学細菌同定の手引き (第2版)、Microbiological Methods (3巻) に準じて行い、実験結果をBergery's Manual of Systematic Bacteriology Vol.1 (1984)、2 (1986) などと対比して同定を行った。

(a) 形態的特徴

端の丸いまっすぐまたはやや曲がった桿状細菌で大きさは0.5~0.7×1.5~3.5μmで周毛で運動する。端または両端に0.8×1.0~2.0μmの梢円~卵形の芽胞を形成し、芽胞によって菌体は膨張する。多形性なし。

(b) 各培地における生育状態

各種培地上で、1~2日、50~52℃で培養し、觀察し

た所見は次の通りである。

①普通寒天平板培地

円形で丘状(convex)の集落を形成する。表面は滑らかで縁は丸い。黄土色～淡黄土色を呈するが、可溶性色素は産生しない。

②普通寒天斜面培地

線状に良好に生育する。淡黄土～黄土色を呈する。可溶性色素は産生しない。

③液体培地(ペプトン水)

生育良好で一様に混濁する。

④リトモスミルク培地

4～5日後、弱酸性になる。

DNAのGCモル% : 41.9モル% (HPLC法)

主たるイソブレノイドキノン : MK-7

(c) 生理的、生化学的性質 [+ ; 陽性、 (+) ; 弱陽性、 - ; 陰性、 NT; 未実験]

グラム染色

+

KOH反応

-

カプセル形成

-

抗酸性染色

-

OFテスト

-

(Hugh-Leifson)

NT

OFテスト

-

(N源にNH₄H₂PO₄)

F

好気での生育

+

嫌気での生育

+

生育温度 70°C

-

60°C

+

37°C

+

30°C

-

食塩耐性 0%

+

3%

+

5%

-

生育pH 5.6

-

6.2

+

9.0

+

ゼラチンの分解

-

澱粉の分解

(+)

カゼインの分解

-

エスクリンの分解

+

チロシンの分解

-

アルギニンの分解

-

セルロースの分解

-

カタラーゼ産生

+

オキシダーゼ産生

+

レシチナーゼ産生

-

ウレアーゼ産生 (SSR)

-

ウレアーゼ産生 (Chris)

-

インドール産生

-

硫化水素産生 (酢酸鉛紙で検出)

...

アセトイン産生 (K₂HPO₄)

-

アセトイン産生 (NaCl)

-

MRテスト

-

硝酸塩還元テスト (ガス産生)

-

(NO₂⁻の検出)

-

(NO₃⁻の検出)

+

シモンズ培地での利用性

-

クエン酸塩

-

リンゴ酸塩

-

マレイン酸塩

-

マロン酸塩

-

プロピオン酸塩

-

グルコン酸塩

-

コハク酸塩

-

クリステンゼン培地での利用性

-

クエン酸塩

+

リンゴ酸塩

-

マレイン酸塩

-

マロン酸塩

+

プロピオン酸塩

-

グルコン酸塩

-

コハク酸塩

+

グルコースよりガスの産生

-

各種糖類より酸の産生

-

アドニトール

-

L (+) アラビノース

-

セロビオース

+

グルシトール

-

メゾ・エリスリトール

-

フラクトース

+

フコース

+

ガラクトース

+

グルコース

+

グリセリン

+

イノシトール

+

イヌリン

+

ラクトース

+

マルトース

+

マンニトール

+

マンノース

+

メレジトース

-

メリビオース

+

ラフィノース

-

ラムノース

-

D-リボース

+

サリシン

+

L-ソルボース

-

ソルビトール

-

澱粉

+

サッカロース

+

トレハロース +
キシロース -
以上の通り、本菌株の主性状は、グラム陽性の桿状細菌で、大きさは $0.5 \sim 0.7 \times 1.5 \sim 3.5 \mu\text{m}$ 、周毛で運動、芽胞形成、多形成なし、グルコースを醜酵的に分解し、酸を産生する。カタラーゼ・オキシダーゼ産生。高温性の通性嫌気性であり、これらのグラム陽性桿菌で芽胞を形成し、好気で生育する特徴から、バチルス属に属すると判断された。

そこで、本菌株がバチルス属のどの種に属するか否かを同定した。即ち、Bergery's Manual of Systematic Bacteriology, Vol. 2によれば、高温(50°C)で生育する菌種はバチルス アシドカルダリウス (*B. acidocaldarius*)、バチルス サブチリス (*B. subtilis*)、バチルス バジウス (*B. badius*)、バチルス ブレビス (*B. brevis*)、バチルス コアグランス (*B. coagulans*)、バチルス リケニフォルミス (*B. licheniformis*)、バチルス パントセンチカス (*B. pantothenticus*)、バチルス シエゲリ (*B. schegelli*)、バチルス ステアロサーモフィルス (*B. stearothermophilus*)の9菌種が記載されている。その内で、嫌気下で生育する菌種はバチルス *B. coagulans* と *B. licheniformis* の2菌種のみである。即ち、*B. coagulans* (以下、「C」と略記する) および *B. licheniformis* (以下、「L」と略記する) と本菌とを対比した結果は、次の通りである。

尚、C、Lおよび本菌で示される「+」は陽性、「(+)」は弱陽性、「-」は陰性、「d」は菌株によって異なる、NDはデータなしであることを示す。

	C	L	本菌
オキシダーゼ産生	-	d	+
芽胞による膨張	d	-	+
嫌気生育	+	+	+
アセトイン産生	+	+	-
グルコース(酸)	+	+	+
L・アラビノース(酸)	+	+	+
キシロース	d	+	-
マンニット(酸)	d	+	+
カゼイン分解	d	+	-
ゲラチン分解	d	+	-
デンプン分解	-	+	(+)
クエン酸塩利用	+	+	-
プロビオン酸塩利用	d	+	-
チロシン分解	-	+	-
LV反応	-	+	-
インドール産生	-	+	-
食塩耐性 2%	+	+	+
5%	-	+	-
7%	-	+	-

	C	L	本菌
生育温度 10%	-	ND	-
40°C	+	+	+
50°C	+	+	+
55°C	+	+	+
60°C	ND	ND	+
70°C	-	-	-
硝酸塩還元	d	+	-
DNAのGCモル%	44.5(Type)	46.4(Type)	41.9
	44.3~50.3	42.9~49.9	

以上対比した結果によれば、本菌株No. 3の諸性状は *Bacillus coagulans* に近いと考えられるが、アセトイン産生能、DNAのGCモル%、また上記対比表には載せていないが、リトモスミルク培地での反応も違っている。

よって、本菌株を公知のものと区別するため、バチルス・エスピ-No. 3 (*Bacillus sp. No. 3*) と命名し、通商産業省工業技術院微生物工業技術研究所に受託番号微工研条寄第3013号 (FERM BP-3013) として寄託した。

本発明においては、先ずバチルス属に属するミオ・イノシトールデヒドロゲナーゼ生産菌が適当な培地に培養される。

上記のミオ・イノシトールデヒドロゲナーゼ生産菌としては、前述のバチルス・エスピ-No. 3が挙げられるが、細菌の一般的な性状として菌学上の性質は変異し得るものであるから、自然的にあるいは通常行われる紫外線照射、放射線照射または変異誘導剤、例えばN-メチル-N'-ニトロ-N-ニトロソグアニジン、エチルメタンスルホネートなどを用いる人工的変異手段により変異し得る人工変異株は勿論、自然変異株も含め、バチルス属に属し、ミオ・イノシトールデヒドロゲナーゼを生産する能力を有する菌株は、すべて本発明に使用することができる。

上記の培養は、細菌の培養に一般に用いられる条件によって行うことができるが、本菌株の培養にあたっては、ミオ・イノシトールデヒドロゲナーゼがミオ・イノシトールによって誘導的に生成される誘導酵素であることから、例えばミオ・イノシトールを0.5~5%含む培地で培養することがミオ・イノシトールデヒドロゲナーゼの生産性を100~300倍程度良好とするので好ましい。

培地としては、ミオ・イノシトールを添加する以外に微生物が同化し得る炭素源、消化し得る窒素源、さらには必要に応じ、無機塩などを含有させた栄養培地が使用される。

同化し得る炭素源としては、グルコース、フラクトース、サッカロースなどが単独または組み合わせて用いられる。消化し得る窒素源としては、例えばペプトン、肉エキス、酵母エキスなどが単独または組み合わせて用いられる。その他必要に応じてリン酸塩、マグネシウム塩、カルシウム塩、カリウム塩、ナトリウム塩、その他、鉄、マンガンなどの種々の重金属塩などが使用され

る。上記以外に公知の同化し得る炭素源、消化し得る窒素源が使用できることはいうまでもない。

培養は、通常振とうまたは通気攪拌攪拌培養などの好気的条件下で行うのがよく、工業的には深部通気攪拌培養が好ましい。培養温度はミオ・イノシトールデヒドロゲナーゼ生産菌が発育し、本酵素を生産する範囲内で適宜変更し得るが、通常は40~60°C、特に50°C付近が好ましい。培養時間は培養条件によって異なるが、本酵素が最高力価に達する時期を見計らって適当な時期に培養すればよいが、通常は1~2日間程度である。

これらの培地組成、培地の液性、培養温度、攪拌速度、通気性などの培養条件は使用する菌株の種類や外部の条件などに応じて好ましい結果が得られるように適宜調節、選択されることは言うまでもない。液体培養において発泡があるときは、シリコン油、植物油などの消泡剤が適宜使用される。

このようにして得られたミオ・イノシトールデヒドロゲナーゼは、主として菌体内に含有されるので、得られた培養物から濾過または遠心分離等の手段により集菌し、この菌体を超音波処理、フレンチプレス処理、ガラスピーズ処理、凍結破碎処理等の機械的破壊手段やリソチーム等の酵素的破壊手段等の種々の菌体処理手段を適宜組み合わせて、粗製のミオ・イノシトールデヒドロゲナーゼ含有液が得られる。

次いで、この粗製のミオ・イノシトールデヒドロゲナーゼ含有液から公知の蛋白質、酵素等の単離、精製手段を用いることによりさらに精製されたミオ・イノシトールデヒドロゲナーゼを得ることができる。例えば粗製のミオ・イノシトールデヒドロゲナーゼ含有液に、硫酸、硫酸ナトリウム等を添加する塩析沈殿法により本酵素を回収すればよい。さらにこの沈殿物は、分子篩、各種の樹脂を用いたクロマトグラフィー法、電気泳動法あるいは超遠心分析法を適宜組み合わせ用いて、必要に応じて精製すればよく、その精製手段としては、目的とするミオ・イノシトールデヒドロゲナーゼの性質を利用した手段を用いればよく、例えば上記の沈殿物を水または緩衝液に溶解した後、必要に応じて半透膜にて透析し、さらにDEAE-セルロース、DEAE-セファセル、DEAE-セファロース、DEAE-セファデックス、Q-セファロース(ファルマシア製)、DEAE-トヨパール(東洋曹達社製)ハイドロキシルアパタイト等のイオン交換樹脂や、オクタルセファロース、フェニル-セファロース(ファルマシア社製)等の疎水クロマト樹脂や、その他のアフィニティーコロマト樹脂が使用される。また、セファデックスG-100、セファアクリルS-200等のゲル濾過剤による分子篩クロマトや、さらに必要に応じて透析膜を用いて脱塩すればよい。その後、必要に応じて糖類、例えばマンニトール、サッカロース、ソルビトール等、アミノ酸、例えばグルタミン酸、グリシン等、ペプタイドまたは蛋白質として牛血清アルブミン等の安定剤の0.05~10

%程度を添加し、凍結乾燥等の処理により精製されたミオ・イノシトールデヒドロゲナーゼの粉体を得ることができる。

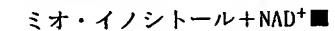
以上の如くして得られたミオ・イノシトールデヒドロゲナーゼの性状は以下の通りである。

(1) 基質特異性

ミオ・イノシトール	100%
グルコース	0
フルクトース	0
ガラクトース	0
ソルビトール	0
マンノース	0
マルトース	0
サッカロース	0
ラクトース	0

(2) 酵素作用

下記式に示すように、少なくともミオ・イノシトールおよびNAD⁺よりミオ・イノソースおよびNADHを生成する反応を触媒する。



* (2, 4, 6/3, 5-ペンタヒドロキシシクロハキサン)

(3) 分子量

130,000±15,000

トーソー社製TSKゲルG3000SW (0.75×60cm) による値、溶出液: 0.2M NaCl含有0.1Mリン酸緩衝液 (pH7.0)、標準品はオリエンタル酵母社製の次の分子量マークを使用。

M.W.	12,400	シトクロムC
M.W.	32,000	アデニレイトキナーゼ
M.W.	67,000	牛血清アルブミン
M.W.	142,000	ラクテートデヒドロゲナーゼ
M.W.	290,000	グルタメートデヒドロゲナーゼ

(4) 等電点

pH4.5±0.5

キャリアアンフォライトを用いる焦点電気泳動法により4°C、700Vの定電圧で40時間通電した後、分画し、各画分の酵素活性を測定した。

(5) Km値

100mM トリス塩酸緩衝液 (pH8.5)、
5U ジアフォラーゼ(東洋醸造社製)、
1mM NAD⁺ (オリエンタル酵母社製)、
0.025% NTB(和光純薬工業社製) 0.1%牛血清アルブミン(シグマ社製)
を含む反応液中でミオ・イノシトールの濃度を変化させて、ミオ・イノシトールに対するKm値を測定した結果は、0.64mMの値を示した。

一方、前記反応液中でNAD⁺の代わりに15mMのミオ・イノシトールを添加し、NAD⁺の濃度を変化させてNAD⁺に対するKm値を測定した結果は、0.004mMの値を示した。

(6) 至適pH

後記の酵素活性測定法に従い、反応液中の100mMトリス塩酸緩衝液(pH8.5)に代えて100mMのリン酸緩衝液(pH6.5~8.0、-○-)、トリス塩酸緩衝液(pH8.0~9.0、-□-)およびグリシン-水酸化ナトリウム緩衝液(pH9.0~10.0、-■-)の各緩衝液を用いて測定した活性の相対値の結果は第4図に示す通りであって、pH9.5付近で最大の活性を示す。

(7) pH安定性

本酵素(1u/mM)を40mMの酢酸緩衝液(pH4.5~6.0、-▲-)、リン酸緩衝液(pH6.0~8.0、-○-)、トリス塩酸緩衝液(pH8.0~9.5、-□-)およびグリシン-水酸化ナトリウム緩衝液(pH9.0~10.0、-■-)の各緩衝液で調製し、50°Cで15分間加熱処理した後、その残存活性を後記の酵素活性測定法に従って測定した結果は、第3図に示す通りであって、pH6.5~9.0の範囲で80%以上の活性を保持している。

(8) 熱安定性

本酵素液(1u/mM)を20mMリン酸緩衝液(pH7)で調製し、15分間加熱処理後、その残存活性を後記の酵素活性測定法に従って測定した結果は、第1図に示される通りであって、60°Cまでは残存活性として95%以上を有する安定なものであつた。

(9) 計算式

$$U / m \ell = \frac{(\Lambda_1 - \Lambda_0)}{18.3} \times \frac{1}{10} \times \frac{3.02}{0.02} \times X$$

18.3 ; 分子吸光係数 $\text{cm}^2 / \mu\text{m} \cdot \text{o}1$

X ; 希釈倍数

〔発明の効果〕

本発明のバチルス属に属するバチルス・エスピ-*No.3*由來の新規な性状を有するミオ・イノシトールデヒドロゲナーゼは60°Cで残存活性として95%以上有する熱安定性に優れている新規な酵素であり、かつ、基質のミオ・イノシトールおよび補酵素のNAD⁺に対するK_m値が非常に低いために優れた反応性を有していることから、本酵素を利用した極めて優れたミオ・イノシトール測定用試薬を提供できる。また本発明の酵素は分離、精製中における失活も少なく、精製も容易であるので、ミオ・イノシトールデヒドロゲナーゼの製法として有利な製造法を提供できる。

次に、実施例を挙げて本発明を具体的に説明するが、これにより本発明を限定するものではない。

実施例 1

バチルス・エスピ-*No.3*の培養

酵母エキス(極東製薬社製)2%、ペプトン(極東製薬社製)2%、リン酸2カリウム(和光純薬社製)0.2

(9) 至適温度

100mMトリス塩酸緩衝液(pH8.5)を用い、後記の酵素活性測定法に従い、35、40、45、50、55、60および65°Cの各温度で10分間反応後、0.1N塩酸mMで反応を停止し、波長550nmで吸光度を測定した相対値の結果は、第2図に示す通りであって、60°C付近で最大の活性を有している。

(10) ミオ・イノシトールデヒドロゲナーゼ活性測定法

① 反応液組成

100mM トリス塩酸緩衝液(pH8.5)、
15mM ミオイノシトール(和光純薬社製)
1mM NAD⁺(オリエンタル酵母社製)
5U ジアフォラーゼ(東洋醸造社製)、
0.025%NBT(和光純薬工業社製品)、
0.1%牛血清アルブミン(シグマ社製)

② 酵素活性測定

上記の反応液1mMを小試験管に入れ、37°Cで5分間インキュベートした後に、適当に希釈した酵素液0.02mMを添加して搅拌し、反応を開始する。正確に10分間反応の後に、0.1N塩酸2.0mMを添加して搅拌し、反応を停止して、λ550nmを測定して吸光度A₁を求める。上記反応液よりミオ・イノシトールを除いた反応液を用いて同様の測定を行い、その吸光度A₀を求める。

1 3 . 0 2

%、塩化カルシウム(和光純薬社製)0.02%、硫酸マグネシウム(和光純薬社製)0.05%、ミオ・イノシトール(和光純薬社製)2%、pH7.3を含む液体培地100mMを50mM容三角フラスコに分注し、120°Cで20分間加熱滅菌した後、これにバチルス・エスピ-*No.3*の1白金耳を接種し、50°Cで120r.p.m.の振とう培養器で30時間培養して種母85mL(酵素活性1.2u/mM)を得た。

一方、上記と同様の培地組成にて消泡剤としてディスフォーム442(日本油脂)を0.1%添加した液体培地20Lを30L容ジャーファメンターに仕込み、加熱滅菌した後に上記の種母85mLを移植し、培養温度50°C、通気量20L/分、内圧0.4kg/cm²、搅拌速度150r.p.m.で24時間通気培養し、培養物18.0L(酵素活性0.8u/mM)を得た。

実施例 2

実施例1で得た培養物を遠心分離で集菌し、これに0.1%リゾチーム(エーザイ社製)を含む20mMリン酸緩衝液(pH7.5)5Lを加え、37°Cで1時間インキュベイトした後、遠心分離して沈殿物を除去し、上清4.5L(6u/m

■)を得た。この上清にアセトンを1.8L添加攪拌し、生じた沈殿物を遠心分離して集め、これを20mMリン酸緩衝液で溶解し1Lの粗酵素液(24.2u/m■)を得た。この溶液に固体硫酸安を200g溶解し、生じた沈殿物を遠心分離して除去し、得られた上清に再び固体硫酸安を250g溶解した。この処理液を遠心分離して得られた沈殿物を20mMリソ酸緩衝液(pH7.5)で溶解し、500m■の酵素液(36.3u/m■)を得た。この酵素液を透析膜(三光純薬社製)を用いて20Lの20mMリソ酸緩衝液(pH7.5)に対して一晩透析し、得られた酵素液を20mMリソ酸緩衝液(pH7.5)で緩衝化したDEAE-セファロースCL-6B(ファルマシア)250m■のカラムに通し、0.1M KClを含む20mMリソ酸緩衝液(pH7.5)1Lを流した後、次いで0.3M KClを含む20mMリソ酸緩衝液(pH7.5)で溶出し、酵素液350m■(35.2u/m■)を得た。得られた酵素液を10mMリソ酸緩衝液(pH7.0)20Lに対して一晩透析した。こうして得られた酵素液に牛血清アルブミン(シグマ社製)を0.2g溶解した後に凍結乾燥して、凍結乾燥標品1.1g(10.6u/mg)を得た。

参考例 1

公知の生産菌によるミオ・イノシトールデヒドロゲナーゼの製造および性質の比較：

Klebsiella pneumoniae IFO12019, *Aerobacter aerogenes* IFO12979および*Serratia marcescens* ATCC1388の培養：ペプトン(極東製薬社製)；5g/■、肉エキス(Difco.)；5g/■、塩化ナトリウム(和光純薬社製)；5g/■、ミオ・イノシトール(和光純薬社製)；10g/■；pH7.0を含む液体培地100m■を500m■容三角フラスコに分注し、120℃、20分間加熱滅菌した後に、上記3株をそれぞれ1白金耳接種し、37℃、100r.p.m.の振とう培養器で48時間培養した後に、遠心分離で集菌し、20mMリソ酸カリウム緩衝液pH7.0に懸濁し超音波破碎器(久保田製作所製)を用いて180W、10分間ソニケイションした後に15000r.p.m.、15分間遠心分離して上清を得た。それぞれの上清の活性を前記(10)ミオ・イノシトールデヒドロゲナーゼ活性測定法で測定した。

	液量(mL)	活性(u/mL)
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	7.0	0.12
<i>Aerobacter aerogenes</i>	6.8	0.15
<i>Serratia marcescens</i>	7.2	0.08

それぞれの酵素液1m■を試験管に分注し、35℃、40

-A_{340nm}

/分 1. 0 5

$$U/m\ell = \frac{6.22}{0.05} \times \frac{1.05}{0.05}$$

6.22 : 分子吸光度係数 $\mu\text{m}^{-1}/\text{cm}^2$

℃、45℃、50℃、55℃、60℃で15分間加熱処理後、その残存活性を活性測定法にしたがって測定した結果を第5図に示す。

Klebsiella ; -○-、

Aerobacter ; -△-、

Serratia ; -□-

参考例 2

Cryptococcus melibiosum IF01871株を用いてBiochemical and Biophysical Acta, 293, 295-303 (1973) 記載の培養条件で培養した。ミオ・イノシトール(和光純薬社製)；0.5%、Bacto-peptone (Difco.)；1%、Bacto-yeast extract (Difco.)；0.5%、pH6.2を含む液体培地100m■を500m■容三角フラスコに分注し、120℃、20分間加熱滅菌した後に上記菌株を1白金耳接種し、25℃、100r.p.m.の振とう培養器で48時間培養した後に遠心分離で集菌し、20mMリソ酸緩衝液(pH7.0)に懸濁し、超音波破碎器(久保田製作所社製)を用いて180W、10分間ソニケイションの後に15000r.p.m.、15分間遠心分離して上清(10m■、21u/m■)を得た。

参考例 3

牛の脳を用いてBiochemical and Biophysical Research Communications, 68, No. 4, 1133-1138 (1976) 記載の方法で牛の脳100gよりホモジネイト、DEAE-cellulose、Sephadex G-100カラムクロマトグラフィーを用いて精製酵素液(50m■)を得た。しかし、文献中にも記載されているように牛の脳の酵素はミオ・イノソースとNADHよりミオ・イノシトールとNAD⁺を生成する方向に活性が大きく傾いており、事実本精製酵素でもミオ・イノソースからミオ・イノシトールの逆方向への活性は0.045u/m■認められたが、正方向の活性はほとんど認められなかった。

ミオ・イノソースとNADHからミオ・イノシトールとNAD⁺を生成する活性の活性測定法

反応液組成

100mM トリス塩酸緩衝液(pH8.5)

10mM ミオ・イノソース(シグマ社製)

0.3mM NADH

活性測定法

上記反応液1m■を石英セルに分注し、37℃で2分間インキュベイトした後に酵素液(前記参考例2および3)0.05m■お添加し、NADHのA_{340nm}における減少を測定する。

それぞれの酵素1mMを試験管に分注し、35°C、40°C、45°C、50°Cで15分間加熱処理後、その残存活性を参考例におけるCryptococcus由来の酵素については(10)の活性測定法に従って測定し、牛の脳由来の酵素については前述の活性測定法に従って測定した結果は第5図に示した。

Cryptococcus melibiosum: -●-

牛の脳: -■-

-□-: リン酸緩衝液(pH 6.5)、-◆-

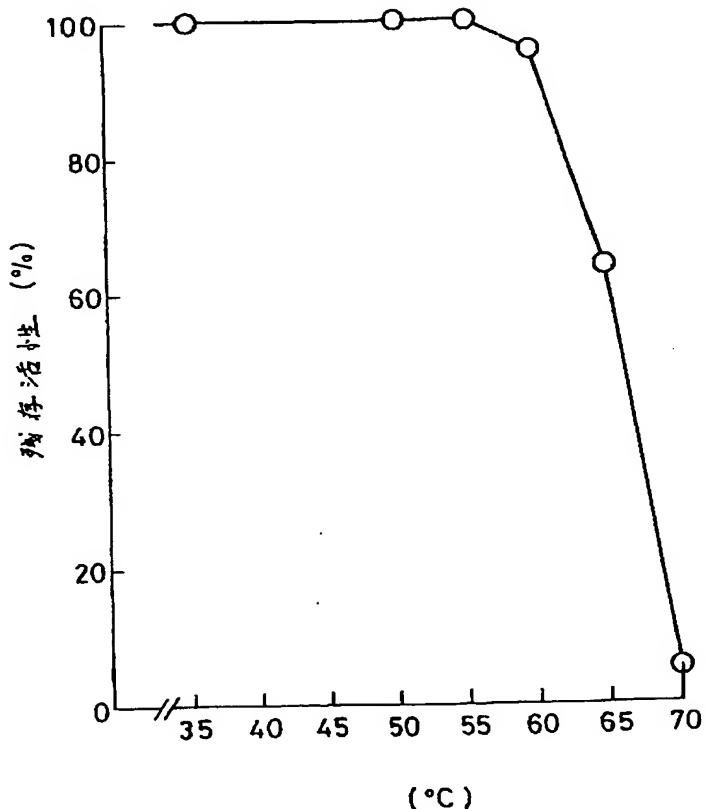
; トリス-塩酸緩衝液(pH 6.5)、-■-; リン酸緩衝液(pH 7.5)、

-◇-; トリス-塩酸緩衝液(pH 7.5)、-□-; リン酸緩衝液(pH 9.0)、-□-; トリス-塩酸緩衝液(pH 9.0)

をそれぞれ示す。この実験結果から明らかのように41°Cにおいて、バチルスサブチリス由来の酵素はリン酸緩衝液およびトリス-塩酸緩衝液において不安定であることが認められる。同様の実験を60°Cまで熱安定性に優れた本発明の酵素を用いて行ったところ、前記いずれの条件下においても100%の活性を保持し、文献酵素と比べて非常に安定な酵素、すなわち耐熱性酵素であることが認められた。

【図面の簡単な説明】

【第1図】

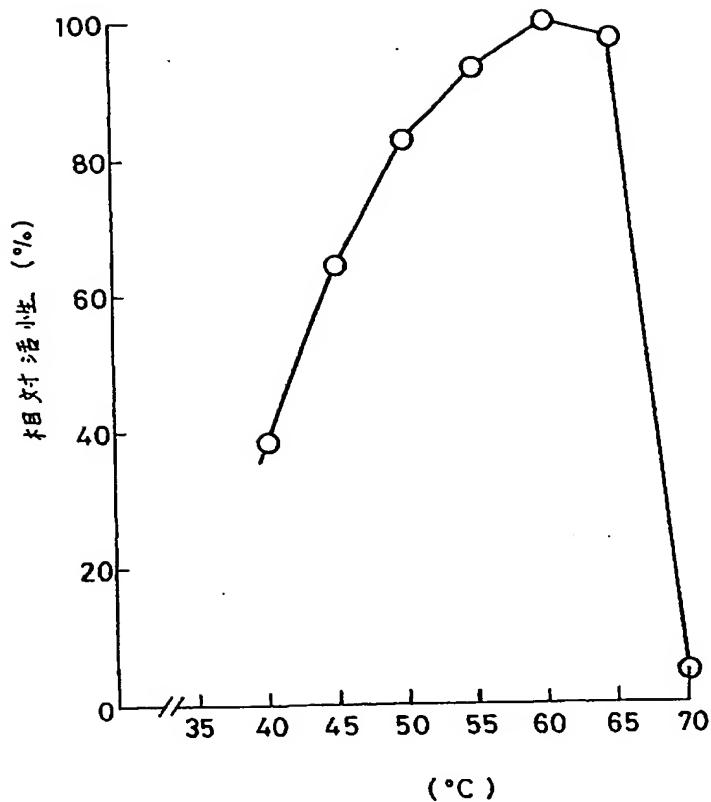


参考例 4

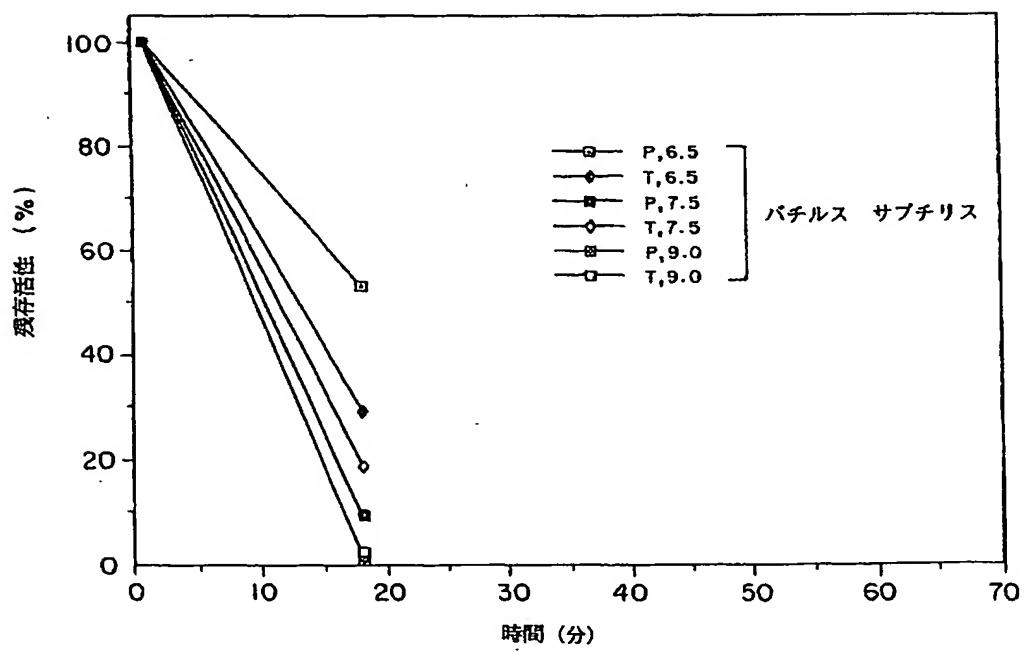
The Journal of Biological Chemistry, 254 (16), p7690, 1979の文献に記載されているように公知のバチルスサブチリス(Bacillus subtilis)由来のイノシトールデヒドロゲナーゼの41°Cにおける熱安定性の実験結果は、第6図に示される通りである。第6図において、

第1図は本発明のミオ・イノシトールデヒドロゲナーゼの熱安定性を示す曲線、第2図はその至適温度を示す曲線、第3図はそのpH安定性を示す曲線、第4図はその至適pHを示す曲線、第5図は本発明のミオ・イノシトールデヒドロゲナーゼの熱安定性を示す曲線であり、第6図は公知のバチルスサブチリス由来のイノシトールデヒドロゲナーゼの41°Cにおける熱安定性を示す曲線である。

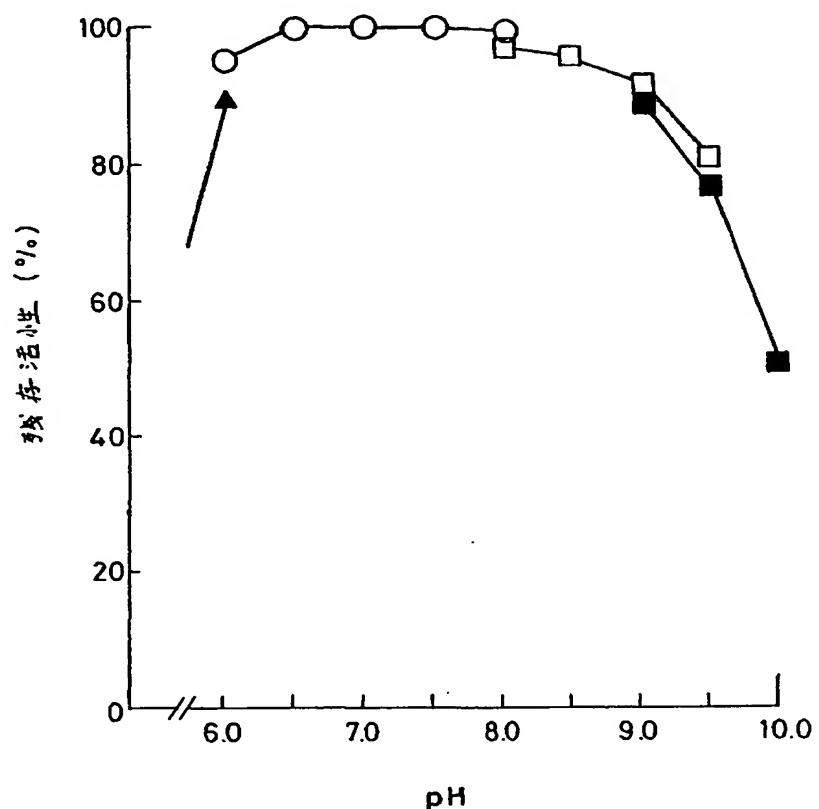
【第2図】



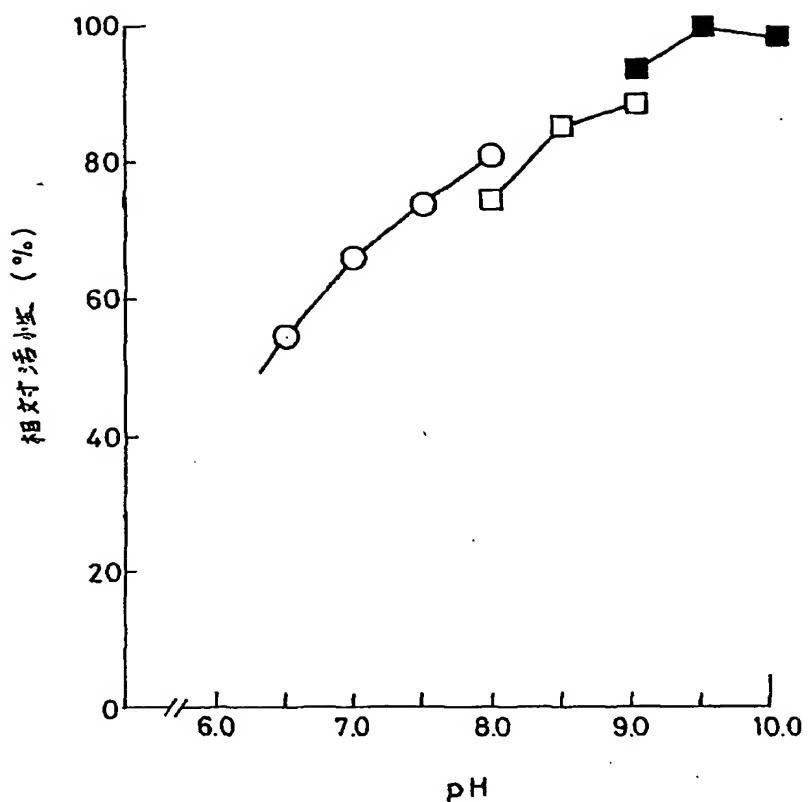
【第6図】



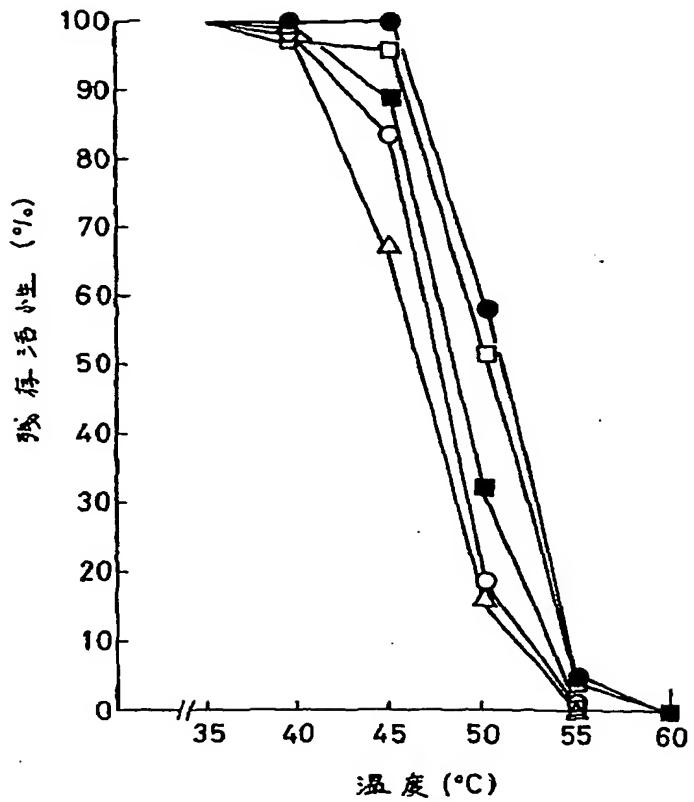
【第3図】



【第4図】



【第5図】



PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 04-126075

(43)Date of publication of application : 27.04.1992

(51)Int.Cl.

C12N 9/04
// (C12N 9/04
C12R 1:07)

(21)Application number : 02-249775

(71)Applicant : ASAHI CHEM IND CO LTD

(22)Date of filing : 18.09.1990

(72)Inventor : TAKAHASHI MAMORU
MATSUURA KAZUO

(54) MYO-INOSITOL DEHYDROGENASE AND PRODUCTION THEREOF

(57)Abstract:

PURPOSE: To obtain myo-inositol dehydrogenase having excellent heat-stability, etc., and exhibiting specific substrate specificity, enzymatic action, etc., at a low cost by culturing a microbial strain belonging to genus *Bacillus* and capable of producing myo-inositol dehydrogenase in a medium and separating the subject enzyme from the cultured product.

CONSTITUTION: A microbial strain belonging to genus *Bacillus* and capable of producing myo-inositol dehydrogenase (e.g. *Bacillus* sp. No.3, FERM BP-3013) is cultured in a medium and myo-inositol dehydrogenase is separated from the cultured product. The enzyme has substrate specificity to myo-inositol and catalyzes the reaction to produce myo-inosose, NADH and H⁺ from myo-inositol and NAD⁺. The residual activity of the enzyme is 195% at 60° C and a reagent for determining myo-inositol in high accuracy can be produced by using the enzyme.

ミオ・イノシトール + N A D⁺ ~~→~~
ミオ・ノソース - N A D H + H⁺

LEGAL STATUS

[Date of request for examination]

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of extinction of right]

Copyright (C) 1998,2003 Japan Patent Office

